

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen über die
Cholinesteraserestaktivität menschlicher
Seren bei Vergiftung mit E 600

Untersuchungen an 45 männlichen Probanden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Albin Johann Pechmann
aus Rattelsdorf

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen über die Cholinesteraserestaktivität menschlicher Seren bei Vergiftung mit E 600

Untersuchungen an 45 männlichen Probanden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Albin Johann Pechmann
aus Rattelsdorf

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 1976

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Problemstellung
- III. Experimentelle Untersuchungen
 - 1. Versuchsanordnung
 - a. Gewinnung des Serums
 - b. Angewandtes Meßverfahren
 - c. Inkubation mit E 600 (Paraoxon)
 - d. Messung der Cholinesteraseaktivität
 - 2. Versuchsergebnisse
 - 3. Auswertung
- IV. Diskussion und Zusammenfassung
- V. Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die Toxizität von Alkylphosphaten wird in der Literatur oft durch die molare Konzentration des Wirkstoffes angegeben, die die Aktivität der Cholinesterasen auf die Hälfte erniedrigt (I_{50}).

Die Versuchsbedingungen, sowie die Art der Cholinesterase bestimmen die I_{50} -Werte. In Tabelle I sind für E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) und Serumcholinesterasen, Werte entsprechend der Literatur aufgeführt.

Tabelle I

I_{50} - Werte für Serumcholinesterasen verschiedener Herkunft (aus der Literatur).

Herkunft des Serums	I_{50}	Autor
?	1,4 x 10^{-7}	Schrader (1963)
Pferd	1,4 x 10^{-7}	Heath (1961)
Ratte	2,63 x 10^{-8}	Heath (1961)
?	1,26 x 10^{-7}	Heath (1961)
Mensch	0,87 x 10^{-8}	Rosival u. Mitarb. (1959)

Nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 fanden GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff.

Die Messungen der Cholinesteraseaktivität legten eine Einteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität nahe. (siehe Tabelle II)

Tabelle II

Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität von 192 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M). (Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al., 1969)

n	Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	
		gemessener Wert	mittlere Restaktivität mit Standardabweichung
128	I	0,0 - 6,0	2,5 $\pm$ 1,1
46	II	12,0 - 22,0	17,2 $\pm$ 2,2
18	III	30,0 - 50,0	39,6 $\pm$ 5,1

Eine Reihe von Fragen, insbesondere nach der Verteilung in der Bevölkerung und eine möglicherweise genetische Bedingtheit ergaben sich aus den unterschiedlichen Messwerten für die Restaktivitäten der Serumcholinesterasen nach Inkubation in vitro mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in bestimmter Konzentration. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (1972) konnten bei 50 Versuchspersonen nachweisen, daß eine hochsignifikante Korrelation zwischen Serumcholinesterase-

Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon und der Aktivität der Serum-Arylesterase (Paraoxonase, E.C.3.1.1.2.) besteht und zwar in der Weise, daß eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraoxonasenaktivität entspricht.

Die menschliche Serumpaaronase ist ein äußerst spezifisches Enzym das auf geringfügigste Veränderungen am Substratmolekül reagiert, wie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PETENYI, FLÜGEL, BURGIS, DIETZEL, METZNER, NIRSCHL und RENNER (1973) aufgezeigt haben.

Aus den Arbeiten von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) geht hervor, daß die menschliche Serumcholinesterase einen Polymorphismus aufweist, der wahrscheinlich genetisch determiniert ist und einem einfachen 2-Allele-Modell folgt, wie die Untersuchungen an 35 Familien mit 52 Kindern ergaben.

II. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Serum von 45 Probanden untersucht, um die gefundenen Unterschiede in der Restaktivität der Serumcholinesterasen weiter zu untersuchen. Die Arbeit verfolgt den Zweck, die Verteilung der drei Gruppen in der Bevölkerung festzulegen.

Insbesondere sollten eventuelle Geschlechtsunterschiede aufgezeigt werden.

Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit nur Seren von männlichen Probanden geprüft, um einen Vergleich mit der Arbeit von AICHINGER, der nur weibliche Seren verwandte, zu ermöglichen.

Als Substrat diente Butyrylcholinjodid.

III. Experimentelle Untersuchungen

1. Versuchsanordnung

Methodik zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität mit Butyrylcholinjodid als Substrat (in der Warburg-Apparatur).

a. Gewinnung des Serums

Es wurde 45 gesunden und zwar männlichen Probanden im Alter von 17 bis zu 72 Jahren, 10 ml Blut entnommen, das etwa eine halbe Stunde nach der Entnahme 15 min bei 1600 U/min zentrifugiert wurde, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden sollte. Das erhaltene Serum wurde sofort abgetrennt und spätestens nach zwei Tagen die Messung durchgeführt. Für die Zwischenzeit erfolgte eine Aufbewahrung im Kühlschrank bei + 5 Grad Celsius.

b. Angewandtes Messverfahren

Die Serumcholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgenden Aktivitätsmessungen abgestimmt. (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER 1973)

c. Inkubation mit E 600 (Paraoxon)

Für die Vergiftung des Fermentes wurde 1 µl E 600 auf 90 ml H₂O gegeben. Je 10 µl dieser Lösung wurden dann zu 13,5 ml der als Verdünnungslösung für das Serum verwendeten Salzlösung, gebracht. Diese Verdünnungslösung war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %-igen NaHCO₃-Lösung. Vor Gebrauch wurde sie mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ durchströmt.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung verdünnt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war $c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar.

Die Ansätze wurden sofort in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,54 %-igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt. Die Warburggefäße wurden nun an Manometer angeschlossen und 20 min in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 begast. Nach dem Begasen wurde noch so lange bei 37°C inkubiert, daß eine Gesamt-Inkubationszeit von 60 min erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (SÜLLMANN).

d. Messung der Cholinesteraseaktivität

Nach beendeter Inkubation wurde die Serumverdünnung in der Anhangsbirne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag bei 7,2 (SÜLLMANN, 1964)

Es wurde bei geöffneten Hähnen 3 min geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min) und anschließend die Manometergefäße geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann 30 min lang alle 15 min abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne E 600 bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat auf ihre Restaktivität getestet. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, in welchen die Anhangsbirne des Kölbchens nur Verdünnungslösung enthielt, wodurch die Eigenhydrolyse des Substrates erfaßt wurde.

Diese Doppelbestimmung wurde zweimal durchgeführt, so-
daß in zwei Versuchsabläufen drei Seren mit jeweils ins-
gesamt vier Leerwerten, vier unvergifteten und vier ver-
gifteten Ansätzen auf ihre Restaktivität geprüft wurden.
Es wurde darauf geachtet, ob der Anstieg der Manometer-
säulen linear erfolgte. War diese Forderung erfüllt,
wurden die 30 min-Werte der Doppelmessung mit der ent-
sprechenden Manometerkonstanten (SÜLLMANN, 1964) multipli-
ziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde
das arithmetische Mittel beider Wertpaare gebildet und
der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Auf die
gleiche Weise wurde der zweite Versuchslauf ausgewertet
und aus beiden Ergebnissen wiederum das arithmetische
Mittel gebildet.

2. Versuchsergebnisse

Die an den 45 Personen gewonnenen Versuchsergebnisse sind
in Tabelle III zusammengestellt und in Abbildung I
graphisch dargestellt.

Tabelle III

Versuchsergebnisse der Messungen der Serum-Cholinesterase-Aktivität mit dem Substrat Butyrylcholinjodid ohne und mit Vergiftung mit E 600 bei 45 männlichen Versuchspersonen.

Versuchspersonen	Alter Jahre	Mittelw. der ChE- Aktivitäten		Mittelwert der Rest- aktivität in % der Ausgangs- aktivität nach Ver- giftung	Blut- gruppe (ABO) und Rh- Faktor	
		vor	nach Vergiftung			
		(in μ l CO ₂ /30 min)				

Niedriger Typ = Gruppe I

Motschenbacher G.	25	111,8	1,6	1,40	O	+
Kapplick H.	36	167,1	2,8	1,65	O	+
Hahn Peter	23	168,0	3,8	2,27	O	+
Kögel Christoph	26	211,7	5,5	2,75	-----	
Fechmann Albin	23	181,6	5,2	2,84	O	+
Leistner Detlev	29	167,9	5,0	2,97	O	+
Helder Egon	22	146,5	4,8	3,27	A ₁	+
Günthlein Peter	25	196,7	7,3	3,73	-----	
Aichinger Hugo	44	101,6	4,2	4,09	A ₁	+
Böhme Bernd	18	128,6	5,1	4,29	-----	
Zöllner Karl	17	141,9	6,1	4,33	-----	
Becker Gerhard	64	301,0	14,0	4,66	A ₁ B	+
Aichinger Werner	24	138,5	6,7	4,78	A ₁	-
Tuffner Martin	25	228,2	10,9	4,79	A ₁	+
Stirnweiß H.	44	218,1	10,9	4,98	A ₂ B	+
Freimark Wolf	23	173,4	8,6	4,99	O	+

Knausdorf Klaus	21	248,7	12,4	5,00	-----
Gebhard Max	24	253,5	13,2	5,21	-----
Ulherr Gerd	23	163,1	8,7	5,36	-----
Willenberg H.	39	160,6	8,7	5,44	A ₂ +
Callender Kay	21	102,9	9,9	6,05	-----
Dietsch Heinrich	23	196,0	11,8	6,06	-----
Pittner Alois	45	230,7	14,3	6,22	A ₁ +
Dietrich E.	43	92,9	6,1	6,65	-----

Mittlerer Typ = Gruppe II

Hübner Walter	60	208,3	24,3	11,66	A ₁ +
Wissner W.	28	128,4	18,0	14,03	-----
Gunbert Franz	32	205,3	29,3	14,18	-----
Wienecke Kurt	24	179,8	25,7	14,32	-----
Lederer Manfred	45	116,7	18,2	15,57	-----
Bopp Gerhard	25	218,4	35,4	16,25	O +
Grunlich Klaus	32	165,8	28,6	17,27	-----
Bittner Erwin	48	222,8	38,9	17,46	O -
Häfner A.	22	106,8	20,4	19,11	-----
Süß Kurt	25	133,1	25,9	19,45	O +
Bindl Georg	25	119,4	40,1	20,55	A ₁ +
Pechmann Georg	72	205,8	43,2	21,01	O +
Twiehaus Jürgen	42	153,5	33,5	21,83	O +
Grigo Bruno	26	178,3	40,1	22,51	B -
Warter Klaus	35	173,6	39,1	22,56	A ₂ +
Siebenhaar A.	31	193,9	43,9	22,63	O +
Lambert Helmut	50	231,8	53,3	22,99	A ₁ +
Brinfeld Klaus	33	155,6	35,8	23,05	-----

Hoher Typ = Gruppe III

Bergmann Kurt	50	210,4	78,6	37,50	O +
Fröhlich Jürgen	19	147,1	56,4	38,38	A ₁ +
Müller Paul	49	262,5	101,1	38,51	O +

3. Auswertung

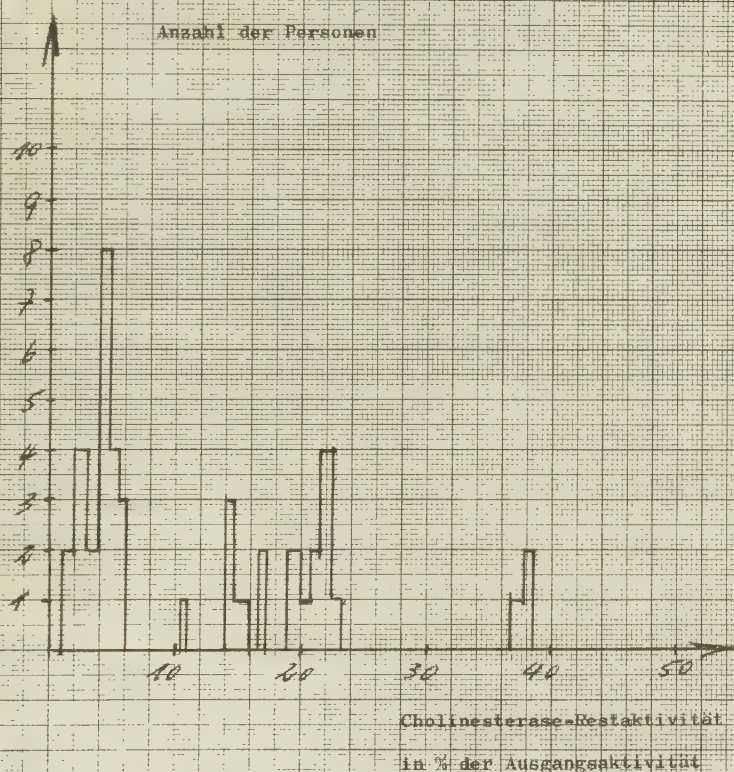
Die einzelnen Gruppen ließen sich unter Verwendung von Butyrylcholinjodid gut unterscheiden, wobei die Gruppe niedriger E 600-spaltender Aktivität eine durchschnittliche Restaktivität von 4,57 %, die mittlere Gruppe eine durchschnittliche Restaktivität von 18,70 % und die hohe Gruppe von 38,13 % aufwies.

Die Verteilung in dem untersuchten Material ergibt sich aus folgender Aufstellung:

Gruppe	Anzahl der Probanden	in %
niedrig	24	53
mittel	18	40
hoch	3	7
gesamt	45	100

Abb. 1

GESAMTVERTEILUNG DER CHOLINESTERASE-
RESTAKTIVITÄT VON 45 PROBANDEN



IV. Diskussion und Zusammenfassung

Die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF und RABAST (1969) gefundenen Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (Paraoxon, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) machten schon bei der relativ kleinen Zahl (50 Seren) der untersuchten Seren eine Einteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität möglich. Ursache hierfür ist, wie weitere Untersuchungen zeigten, eine unterschiedliche Paraoxonase-Aktivität, die über die Cholinesterase-Restaktivität sehr sicher zu bestimmen ist.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Aufklärung der Verteilung der drei Gruppen bei Männern, die zwar eine zuverlässige Aussage über die Gesamtverteilung in der Bevölkerung nicht zulässt, aber doch ähnliche Ergebnisse wie bei GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF und RABAST zeigt. Sie fanden:

	Gruppe	mittlere Cholinesterase- Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Anteil der Probanden in %
I	niedrig	2,5	66
II	mittel	17,2	25
III	hoch	39,6	9

Im Vergleich hierzu die Ergebnisse dieser Arbeit.

I	niedrig	4,57	53
II	mittel	18,70	40
III	hoch	38,13	7

In Übereinstimmung damit stehen die Ergebnisse von AICHINGER, der 57 weibliche Probanden untersuchte. Er fand:

Gruppe		mittlere Cholinesterase- Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Anteil der Probanden in %
I	niedrig	4,82	42
II	mittel	17,75	49
III	hoch	38,00	9

Im Vergleich mit der Arbeit von AICHINGER, der Frauen untersuchte, konnte kein Zusammenhang zwischen Geschlecht der Probanden und der Cholinesterase-Restaktivität namhaft gemacht werden.

Für gesicherte statistische Aussagen sind weitere Untersuchungen unerlässlich.

V. Literaturverzeichnis

1. AMMON, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

2. FRIEDBERG, K.D. und SAKAI :

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Al-
kylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und
Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden
Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

3. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., W. BAUMGARTNER, M. PETENYI, H. BURGIS, H.H. LINDORF und H. METZNER:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Ver-
giftbarkeit der Serumcholinesterase durch E 600
und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-
Systems in menschlichen Seren
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 353, 217 (1972)

4. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6.-9.10.69

5. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLUGEL, M., FISCHER, TH. und
HILLER, TH.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraoxonase (E.C.3.1.1.2.)
Humangenetik 17, 331 - 335 (1973)

6. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., PETENYI, M.
FLUGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, M.,
NIRSCHL, H. und RENNER, C.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 337 - 340
(März 1973)

7. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-
(p-nitrophenyl)-phosphat)
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

8. HEATH, D.F.:

Organophosphorus poisons
Oxford-London-New York-Paris: Pergamon (1961)

9. KIMMERLE, G. und D. LORKE:

Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester
Pflanzenschutznachrichten Bayer 21, 111 (1968)

10. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
-phosphat (E 600) durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 6, 41 (1967)
11. ROSIVAL, VROBOVSKY and SELECKY:
Toxokologia a farmakobodynamika organo-
fosforovich zlucenin, Bratislava 1959
Zit. nach KIMMERLE und LORKE, 1968
12. SCHRADER, G.:
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-
ester
Weinheim/ Bergstr.: Verlag Chemie, 1963
13. SÜLLMANN, E.:
Manometrische Methoden zur Untersuchung des
Gewebestoffwechsels
In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-
Chemischen Analyse, hrsg. von K. Lang und E. Lehn-
arzt, Bd. VI A, Teil A. Berlin-Göttingen-Heidelberg-
New York: Springer 1964
14. WHITTAKER, M.:
The pseudocholinesterase variants. Differentiation
by means of alkyl alcohols
Acta genet. (Basel) 18, 325 (1968)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Albin Pechmann, bin am 26. März 1950 in Rattelsdorf als Sohn des Elektroingenieurs Georg Pechmann und seiner Ehefrau Rosa, geboren.

Nach vier Jahren Volksschule in Rattelsdorf wechselte ich auf das math.-nat.wiss. Clavius-Gymnasium in Bamberg, nach fünf Schulklassen von da zum Dientzenhofer-Gymnasium, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Im WS 69/70 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen.

Nach dem WS 70/71 absolvierte ich das Vorphysikum, nach dem SS 72 das Physikum.

Nach dem Physikum begann ich mit den Untersuchungen im Rahmen meiner Doktorarbeit.

~~Im SS 75 meldete ich mich zur Erlangen-Prüfung an.~~

Am 30. Januar 1976 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.

Albin Johann Pechmann

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197